Article extrait de :

TIFFON YVES. - Digestion extracellulaire, digestion intracellulaire et nutrition chez les Cérianthaires.
(Thèse Sc. Nat. : Aix-Marseille II : 1974. - N° A.O. 9665).

NORTH HOLLAND

AMSTERDAM

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

J. exp. mar. Biol. Ecol., 1975, Vol. 18, pp. 243–254; © North-Holland Publishing Company

HYDROLASES DANS L'ECTODERME DE *CERIANTHUS LLOYDI* Gosse, *CERIANTHUS MEMBRANACEUS* Spallanzani ET *METRIDIUM SENILE* (L.): MISE EN ÉVIDENCE D'UNE DIGESTION EXTRACELLULAIRE ET EXTRACORPORELLE

YVES TIFFON

Université de Caen, Laboratoire Maritime, Luc-sur-Mer, France

Résumé: Une digestion extracellulaire et extracorporelle est mise expérimentalement en évidence. Cette digestion s'opère quand une proie vient au contact des cellules de l'ectoderme des tentacules labiaux des Cérianthes.

Des hydrolases ont par ailleurs été caractérisées dans l'ectoderme de la colonne de *Cerianthus lloydi* Gosse et de *Metridium senile* (L.). Dans ces structures, une enzyme ayant les caractères de la trypsine paraît être contenue dans des granules se colorant très fortement par le p-dimethylaminobenzaldehyde. Maisil n'a pas été démontré que cette enzyme intervienne dans la digestion.

Abstract: An extracellular and extracorporeal contact digestion has been experimentally demonstrated in certain Anthozoa. This digestion occurs when the prey comes into contact with the ectodermal cell layer of the labial tentacules of *Cerianthus* species.

Hydrolases are present in the ectoderm of the columns of *C. lloydi* and *Metridium senile*. In these structures, a trypsin-like enzyme is contained in granules which show a strong reaction with p-dimethylaminobenzaldehyde, but there is no evidence that this enzyme plays any part in digestion.

INTRODUCTION

L'analyse des travaux réalisés à ce jour dans le domaine de la digestion chez les Anthozoaires permettaient jusqu'ici de résumer la séquence des phénomènes de la façon suivante: 1) digestion extracellulaire dans la cavité gastrique par les enzymes sécrétées par les cellules glandulaires des entéroïdes (Gibson & Dixon, 1969; Tiffon & Bouillon, en prép.); et 2) digestion intracellulaire par les enzymes lysosomiales de l'endoderme des cloisons septales et des tentacules (Tiffon, 1973; Tiffon & Daireaux, 1974). Dans le cas des Cérianthes, les étapes de la digestion d'une proie sont précédées par la phase de la capture. Cette phase comprend elle même deux temps récemment décrits par Arai & Walder (1973) chez *Pachycerianthus fimbriatus*; 1) capture proprement dite par les tentacules marginaux; et 2) transfert de la proie des tentacules marginaux aux tentacules labiaux.

Dans mes élevages de Cérianthes et à l'occasion d'expériences de nutrition, j'ai remarqué que les proies capturées, après l'étape du transfert – et avant leur disparition dans la cavité gastrique – étaient maintenues en contact intime avec les tentacules labiaux. La durée de ce contact étant proportionnelle à la taille de la proie, j'ai pensé que cette période pouvait constituer une étape supplémentaire dans la nutrition des Cérianthes consistant en un début de digestion extracellulaire et extracorporelle.

Après avoir mis expérimentalement en évidence cette digestion, j'ai cherché à localiser et à caractériser quelques hydrolases dans l'ectoderme des tentacules et dans les tissus de même origine embryologique mais plus accessibles à l'analyse biochimique.

Matériel et Méthodes

Les Cérianthes (*C. lloydi* Gosse et *C. membranaceus* Spallanzani) proviennent de la Baie Sainte Anne (Cherbourg) ou de la Baie de Tamaris (Toulon). Les *Metridium* sont recueillis par marée de vive eau sur les vestiges de caissons 'Mulberries' de Port Churchill, Arromanches (Calvados).

Histologie, histochimie

Les coupes destinées à la morphologie générale sont colorées par le Trichrome de Cason (1950). Les autres colorations pratiquées sont le Bleu Alcian–Acide périodique–Schiff pour la mise en évidence des mucopolysaccharides et des mucoprotéines (Mowry, 1963). Le tryptophane est détecté par la méthode de Lison et Pinheiro (Lison, 1960).

Digestion de la gélatine de plaques photographiques

La méthode de Gates (1927), déjà utilisée par Bouillon (1966) dans une étude sur les protéases d'Hydroïdes et d'Hydroméduses a été employée. Des plaques photographiques Ilford 4.90 × 4.90 cm, N°60, Photochemical Plate, ont été utilisées. Après développement, fixation et séchage, les plaques sont placées dans une boîte de Pétri et recouvertes de Tampon Tris 0.1 M, pH 8.2 à la température de la pièce pendant 2 h. Elles sont ensuite séchées pendant 1 h et les abdomens de crevette ou les extraits cytoplasmiques sont mis au contact des plaques pendant des durées variant de 30 min à 2 h, à l'étuve à 35 °C en atmosphère humide. La digestion étant terminée, les plaques sont refroidies au réfrigérateur et lavées sous le robinet de façon à entraîner les grains d'argent initialement inclus dans la gélatine et qui en ont été libérés par la digestion.

Préparation des extraits cytoplasmiques

La technique est inspirée de celle employée par Jeuniaux (1962) chez *Actinia*. Les animaux sont débarrassés de leur gaine et congelés à −15 °C pendant 1 h. Replacés à la température de la pièce, l'ectoderme est enlevé par grattage au début de la phase de décongélation. La mésoglée sous jacente offre une résistance mécanique suffisante pour éviter toute souillure de l'endoderme par l'ectoderme. La partie externe de la mésoglée est ensuite nettoyée avec du papier Kleenex, puis l'endoderme est extrait du sac constitué par la mésoglée par une pression péristaltique d'arrière en avant. Ectoderme et endoderme sont broyés au Potter, agités pendant 30 minutes dans 5 volumes

d'acétone refroidi à −15 °C, puis dans 5 vol d'acétone–éther (v/v)(Bundy & Gustafson, 1973). Pendant 12 h à froid, la poudre est agitée dans 15 ml d'eau salée contenant 1 g de NaCl 0.15 M. 1 % de Brij 35[1] est ajouté (Coan & Travis, 1970) au milieu d'extraction, puis l'extrait est centrifugé à 15,000 *g* pendant 30 min.

DOSAGES

Les techniques utilisées pour le dosage des hydrolases sont présentées dans le Tableau I. Les protéines sont dosées par la méthode de Hartree (1972). Les substrats suivants on été employés: p-nitrophenyl phosphate, p-nitrophenyl-β-glucoside, p-nitrophenyl-β-galactoside, p-nitrophenyl-N-acetyl-β-glucosaminide (Sigma); Hémoglobine (Miles Severac); Phénolphtaleine glucuronide (Calbiochem); Benzoyl arginine-p-nitranilide, BAPA[1] (Boehringer). Les unités utilisées sont les suivantes: phosphatase acide; moles de nitrophénol libérées par g de protéine et par heure: N-acetyl-β-glucosaminidase, β-glucosidase, β-galactosidase; mM de nitrophénol libérées par g et par h: β-glucuronidase; mM de phénolphtaléine libérées par g et par h: cathepsine, μg de tyrosine libérée par mg et par h.

Résultats

MISE EN ÉVIDENCE D'UNE ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE À PH 8.2 DANS L'ECTODERME DES TENTACULES LABIAUX DES CÉRIANTHES

Les proies utilisées pour la mise en évidence d'une sécrétion d'enzymes au contact des tentacules consistent en abdomens ou fragments d'abdomen de *Crangon* bouillis et par conséquent débarrassés de leurs enzymes. L'abdomen est fixé à un hameçon et l'hameçon est relié à un fil de nylon tenu par l'expérimentateur. Amené au contact des tentacules marginaux, le fragment d'abdomen est brutalement transféré aux tentacules labiaux par l'animal. Le fil de nylon est alors tendu par l'expérimentateur de manière à ce que la proie ne soit pas entraînée dans le pharynx puis dans la cavité gastrique. Les tentacules marginaux reprennent rapidement leur position d'attente en couronne tandisque les tentacules labiaux s'appliquent intimement à la proie (Figs 1 et 2).

Laissé au contact pendant 1 h, le fragment d'abdomen est ensuite retiré par traction sur le fil de nylon. Il n'est pas rare d'entraîner au cours de cette opération des tentacules labiaux ancrés dans la proie par les nématocystes et qui sont sectionnés au cours de la traction. La proie débarrassée des tentacules est placée sur la gélatine de plaques photographiques en même temps que des fragments d'abdomen bouillis et imprégnés de tampon utilisés comme témoins.

[1] Abréviations utilisées dans le texte de cette note: TCA, acide trichloracétique; Brij 35, polyoxyéthylène-23-lauryl ether (Sigma); p-dmab, para dimethylaminobenzaldehyde; PAS, acide periodique–Schiff; BAPA, benzoyl arginine-p-nitranilide.

TABLEAU I

Incubation et dosage des hydrolases.

Enzyme	Volume final (ml)	Concentration du substrat	pH	Tampon	Manipulation après incubation	Dosage	Référence
Phosphatase acide	1.5	p-nitrophényl phosphate 32 mM	5	Acétate 0.2 M	Addition 2 ml tampon Tris-phosphate M, pH 8.5		
β-glucosidase		p-nitrophényl-β-glucoside	4			Mesure du nitrophénol, 420 mμ	Barrett (1972)
β-galactosidase	1.5	p-nitrophényl-β-galactoside	4	Citrate 0.05 M	Addition de tampon carbonate-bicarbonate 0.5 M		
N-acétyl-β-glucosaminidase		p-nitrophényl-N-acétyl-β-glucosamide 15 mM	4.3				
Cathepsine D	1	Hémoglobine dénaturée, 1.7%	3.5	Acétate 0.15 M	Addition TCA[1] froid a 5%, 2.5 ml	Dosage des produits aromatiques de dégradation, 660 mμ	Bowers *et al.* (1967) Anson (1938)
β-glucuronidase	2	Phénolphtaléine glucuronide 1.25 mM	4	Acétate 0.05 M	Addition de 5 ml d'une solution contenant: 1.33 mM glycine 83 mM NaCl 67 mM CO_3Na_2	Dosage de la phénolphtaléine, 540 mμ	Gianetto et De Duve (1955)
Trypsine	2.4	Benzoylarginine p-nitranilide 1.2 mM	8.2	Tris 0.1 M 0.05 M $CaCl_2$	Développement de la réaction pendant 15 min à 25 °C	Mesure à 405 mμ	Erlanger *et al.* (1961)

Figs 1, 2. Nutrition de *Cerianthus membranaceus* au moyen d'une proie expérimentale: Pr, fragment d'abdomen de *Crangon* fixé sur un hameçon; Tm, tentacules marginaux. Les tentacules labiaux ne sont pas visibles sur les photos 1 et 2.

Fig. 3. Digestion de la gélatine des plaques photographiques: O, technique utilisée, fragment, d'abdomen test, TEST; fragment d'abdomen témoin, TEM: A, digestion de la gélatine après contact de la proie avec les tentacules labiaux de *Cerianthus membranaceus*, test, AB, témoin, CD: B; digestion de la gélatine par un homogénat de gastroderme de *Cerianthus lloydi*; test, AB, témoin, CD: C, digestion de la gélatine par des extraits d'ectoderme de *Cerianthus lloydi* et de *Metridium senile*; extrait d'ectoderme de *Cerianthus lloydi*, AB; extrait d'ectoderme de *Metridium*, CD.

DIGESTION DE LA GÉLATINE PAR DES ABDOMENS AYANT ÉTÉ PLACÉS AU CONTACT DES TENTACULES LABIAUX DES CÉRIANTHES ET DES TENTACULES DE *Metridium*

Après 1 h de digestion, la gélatine a été digérée par les sécrétions retenues sur les abdomens mis au contact des tentacules labiaux des Cérianthes et les grains d'argent ont été libérés (Fig. 3). Une enzyme protéolytique active à pH 8.2 est donc sécrétée au niveau des tentacules labiaux. Cette expérience ne démontre pas si une sécrétion protéolytique est libérée par les tentacules marginaux. Toutefois, le contact est tellement fugace, que cette sécrétion, si elle existe, ne peut pas imprégner les proies très fortement. Il convient de noter que les abdomens mis au contact des tentacules de *Metridium* n'ont produit aucune digestion au bout d'une heure. A titre de comparaison, un abdomen de crevette prélevé au bout d'une heure de digestion dans la cavité gastrique d'un Cérianthe a fourni les résultats de la plaque B (Fig. 3).

DIGESTION DE LA GÉLATINE PAR DES EXTRAITS DE L'ECTODERME DE LA COLONNE DE *Cerianthus* ET DE *Metridium*

La structure histologique des tentacules labiaux et de l'ectoderme de la colonne de *Cerianthus* ayant de nombreux points communs nous avons cherché si nous retrouvions dans l'ectoderme de la colonne de *Metridium* et de *Cerianthus* une même activité

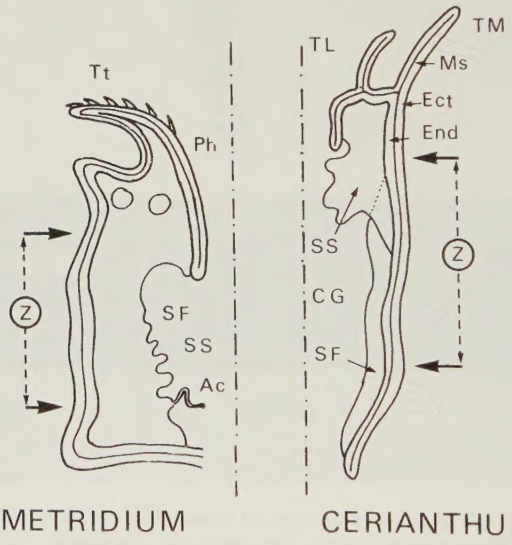
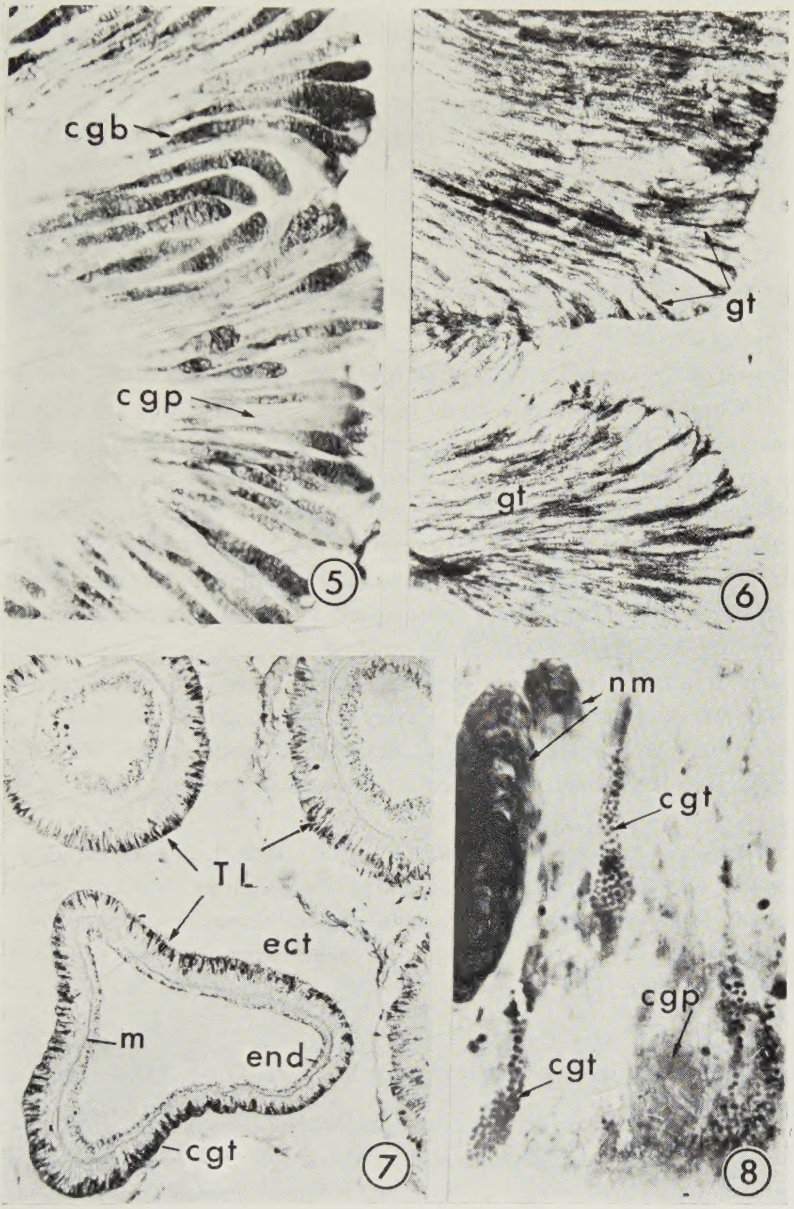


Fig. 4. Coupes schématiques de *Metridium* et de *Cerianthus*: zone de prélèvement de l'ectoderme de la colonne, Z; tentacules, Tt; pharynx, Ph; septum fertile, SS; acontie, Ac; tentacules labiaux, TL; tentacules marginaux, TM; mésoglée, Ms; ectoderme, Ect; endoderme, End; cavité gastrique, CG.

enzymatique décelable par la digestion de la gélatine d'une plaque photographique. Dans les deux cas, l'ectoderme a été prélevé dans la zone Z indiquée sur la Fig. 4.



Figs 5, 6. Ectoderme de la colonne de *Metridium*: cellules glandulaires Bleu alcian positives, cgb; cellules glandulaires PAS positives, cgp; granulations p-dmab positives, gt.
Fig. 7. Sections de tentacules labiaux de *Cerianthus lloydi*: tentacules labiaux, TL; ectoderme, ect; endoderme, end; mésoglée, m; cellules glandulaires à trypsine p-dmab positives, cgt.
Fig. 8. Ectoderme de la colonne de *Cerianthus lloydi*: cellules glandulaires PAS positives, cgp; granulations p-dmab positives, cgt; nématocystes, nm.

Deux gouttes du surnageant obtenu après centrifugation ont été prélevées à la pipette Pasteur et appliquées en AB et CD, plaque C. Les résultats de la Fig. 3 indiquent qu'il existe dans les tentacules des Cérianthes et de *Metridium* et dans l'ectoderme des colonnes de ces mêmes animaux une enzyme capable de digérer la gélatine à pH 8.2. Les résultats des plaques A, B et C indiquent seulement une différence dans l'activité de ces enzymes. Le mode opératoire et le mode de préparation de ces enzymes peut d'ailleurs à lui seul expliquer ces différences.

STRUCTURE ET HISTOCHIMIE DE L'ECTODERME DE LA COLONNE DE *Cerianthus* ET DE *Metridium*

L'ectoderme de *Cerianthus* a fait l'objet d'une étude détaillée de la part de Tiffon, Bouillon & Compte (1969). Cette étude a permis de distinguer 3 couches dans cet ectoderme: une couche externe ou épithéliale, une couche moyenne représentée par un plexus nerveux, une couche basale contenant les fibres musculaires. La couche externe épithéliale retiendra seule notre attention. D'après leur aspect morphologique et les réactions histochimiques de leur contenu, on peut classer les cellules glandulaires épithéliales en 3 catégories: cellules glandulaires spumeuses, cellules glandulaires sphéruleuses et cellules glandulaires granuleuses. Les tests histochimiques pratiqués ont montré que les cellules glandulaires spumeuses contiennent des mucopolysaccharides acides sulfatés (sulfomucines). Les cellules glandulaires sphéruleuses contiennent des mucopolysaccharides carboxylés et des mucopolysaccharides neutres. Quant aux cellules granuleuses, elles sont riches en mucopolysaccharides neutres et en protéines. Elles renferment en outre du tryptophane révélé par la réaction au p-dmab.

L'ectoderme de *Metridium* est plus simple. Il ne contient que des cellules glandulaires du type spumeux. Ces cellules glandulaires se colorent en bleu par le Bleu Alcian elles prennent le PAS. Il n'y a pas des cellules glandulaires granuleuses, mais entre les cellules spumeuses, on trouve une grande abondance des grains p-dmab positifs (Figs 5, 6, 8 et Tableau II).

STRUCTURE ET HISTOCHIMIE DES TENTACULES DE *Cerianthus* ET DE *Metridium*

Par rapport à l'ectoderme de la colonne, la structure histologique des tentacules, telle qu'elle est révélée par l'histochimie est plus simple. Il y a toutefois des différences entre les tentacules labiaux et les tentacules marginaux. Ceci a d'ailleurs été noté par Emig *et al.* (1972) chez *Cerianthus maua*. Les tentacules marginaux présentent de nombreux replis, ils sont riches en spirocystes et pauvres en cellules glandulaires et en mastigophores microbasiques. Les cellules glandulaires spumeuses paraissent absentes. On rencontre de rares cellules glandulaires prenant le PAS mais dont on ne sait pas s'il faut les rattacher au type des cellules sphéruleuses ou granuleuses (Fig. 10 et Tableau II).

Fig. 9. Tentacule de *Metridium senile:* mésoglée, m; spirocyste, sp.
Figs 10–12. Fig. 10. Tentacule marginal de *Cerianthus lloydi*. Figs 11, 12. Tentacule labial de *Cerianthus lloydi*: endoderme, end; mésoglée, m; cellules glandulaires p-dmab positives, cgt; spirocyste, sp; nématocyste mastigophore microbasique, mg; cellules glandulaires PAS positives, cgp; cellules glandulaires Blue Alcian positives, cgb.
Fig. 13. Tentacule de *Metridium senile*: cellules glandulaires Bleu Alcian positives, cgb.

Les tentacules labiaux sont plus riches en mastigophores microbasiques qu'en spirocystes. Les cellules glandulaires spumeuses sont Bleu Alcian et PAS positives. La distinction entre cellules glandulaires sphéruleuses et granuleuses est également difficile à faire mais il apparaît que ces cellules sont positives au réactif d'Ehrlich. Les hampes des mastigophores prennent également le p-dmab (Figs 7, 11, 12 et Tableau II).

TABLEAU II

Répartition des sécrétions et des nématocytes dans l'ectoderme des tentacules de *Cerianthus lloydi* et de *Metridium senile*.

	Cellules glandulaires spumeuses	Cellules glandulaires sphéruleuses	Eléments p-dmab(+)	Digestion de la gélatine	Nématocystes
Tentacules marginaux *Cerianthus*	Rares	Rares	Rares	?	Spirocystes très nombreux
Tentacules labiaux *Cerianthus*	Bleu Alcian (+)	PAS(+) abondants	Abondants	+	Mastigophores microbasiques plus nombreux que spirocystes
Tentacules *Metridium*	PAS ou Bleu Alcian (+)	0	Rares	0	Spirocystes nombreux

Les tentacules de *Metridium* contiennent de nombreux spirocystes et des glandes en massue de type spumeux Bleu Alcian et PAS positives (Figs 9, 13 et Tableau II). On rencontre quelques éléments prenant le réactif d'Ehrlich, ils sont peu nombreux et leur structure n'a pu être identifiée avec exactitude.

DISCUSSION

Notre essai de digestion expérimentale chez *Cerianthus membranaceus* au moyen d'une proie préalablement débarrassée de ses enzymes a permis de mettre en évidence la sécrétion par l'ectoderme des tentacules labiaux d'une enzyme protéolytique active à pH 8.2. Le réactif d'Ehrlich permet de révéler cette enzyme *in situ*. En effet, le p-dmab se condense avec les pyrrols et les indols en donnant une coloration violette. *In vitro*, les expériences ont montré que seuls le tryptophane, la tryptamine et la sérotonine étaient positives (Barka & Anderson, 1965). Cette réaction est d'une haute spécificité (Lison, 1960) car seuls réagissent les cycles pyrroliques avec les positions α et β libres. Cette réaction introduite par Lison, en 1933 à l'occasion d'un travail consacré à la glande pourpre du *Murex* a été ensuite utilisée chez les Vertébrés pour la mise en évidence de structures riches en tryptophane. C'est le cas pour les grains de

trypsinogène et de chymotrypsinogène du pancréas et les cellules à pepsinogène de l'estomac, qui contiennent respectivement 4.6, 5.6 et 2.4 % de leur azote protéique sous forme de tryptophane (Lillie, 1956). Les grains p-dmab positifs trouvés en grande abondance dans les tentacules labiaux des Cérianthes pourraient donc être assimilés à des grains de trypsine. La détection de la trypsine par un substrat spécifique, le BAPA dans des structures comme l'ectoderme de *Cerianthus* ou de *Metridium* où on trouve également des granulations p-dmab positives confirme cette éventualité.

La trypsine trouvée dans la colonne de *Cerianthus* et de *Metridium* pose un problème qui pour la première fois a été implicitement soulevé par Jeuniaux (1962) lorsqu'il a mis en évidence une chitinase dans l'ectoderme d'*Actinia*. On voit mal en effet sur quel substrat pourrait agir la chitinase détectée dans l'ectoderme d'*Actinia*. La trypsine pose un problème identique dans l'ectoderme de *Cerianthus* et de *Metridium*. Son activité maximale à un pH élevé empêche d'envisager sa participation à une activité digestive intracellulaire. Les autres hydrolases mises en évidence dans l'ectoderme de la colonne pourraient être impliquées dans des phénomènes de morphogenèse (Tableau III). Il convient de signaler sans pour autant l'expliquer, l'énorme

TABLEAU III

Activité spécifique des hydrolases dans différents tissus d'Anthozoaires.

	Ectoderme de *Metridium*	Ectoderme de *Cerianthus*	Gastroderme de *Cerianthus*
Phosphatase acide	0.170	0.230	1.44
N-acetyl-β-glucosaminidase	4.22	7.24	33.76
β-glucosidase	0.061	0.252	0.472
β-galactosidase	0.08	0.38	0.416
β-glucuronidase	0.02	0.46	0.56
Cathepsine D	9.08	156.10	244.6
Trypsine	70	6.05	10.8

activité spécifique de la trypsine dans l'ectoderme de la colonne de *Metridium*. Replacée dans le cadre d'une digestion extracorporelle, la présence de trypsine dans les tentacules est moins insolite. Son rôle est à rapprocher du rôle avancé par Péquignat (1972) pour les hydrolases de l'ectoderme des Echinodermes. Si ce type de digestion est mécaniquement envisageable dans le cas de la capture des grosses proies par les Cérianthes, l'est-il dans les autres cas évoqués?

On a parlé à propos du pouvoir bactériostatique du mucus du *Murex* de phénomènes d'antibiose (Pérès, 1961). Ne faudrait-il pas rechercher dans le mucus des Invertébrés marins un équipement enzymatique produit par exocytose et suffisamment actif pour avoir un rôle nettoyant et même digestif? Dans certains cas favorables dont les Cérianthes, ce mucus pourrait être utilisé pour la digestion partielle des proies macroscopiques.

Bibliographie

Anson, M. L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. gen. Physiol.*, Vol. 22, pp. 79–89.

Arai, M. N. & G. L. Walder, 1973. The feeding response of *Pachycerianthus fimbriatus* (Ceriantharia). *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 44A, pp. 1085–1092.

Barka, T. & P. J. Anderson, 1965. *Histochemistry*. Harper and Row, New York, Evanston, London, 660 pp.

Barrett, A. J., 1972. Lysosomal enzymes. In, *Lysosomes. A laboratory handbook*, edited by J. T. Dingle, North-Holland Publishing Company, pp. 46–135.

Bouillon, J., 1966. Les cellules glandulaires des Hydroïdes et des Hydroméduses. Leur structure et la nature de leurs sécrétions. *Cah. Biol. mar.* T. 7, pp. 157–205.

Bowers, W. E., J. T. Finkenstaedt & C. de Duve, 1967. Lysosomes in lymphoïd tissue. I. The measurement of hydrolytic activities in whole homogenates. *J. Cell Biol.*, Vol. 32, pp. 325–337.

Bundy, H. F. & J. Gustafson, 1973. Purification and comparative biochemistry of a protease from the starfish *Pisaster giganteus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 44B, pp. 241–251.

Cason, J. E., 1950. A rapid one-step Mallory-Haidenhain stain for connective tissue. *Stain Technol.*, Vol. 25, pp. 225–226.

Coan, J. E. & J. Travis, 1970. Comparative biochemistry of proteases from a Coelenterate. *Comp. Biochem. Pysiol.*, Vol. 32, pp. 127–139.

Erlanger, B. F., N. Kokowsky & W. Cohen, 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, T. 95, pp. 271–278.

Emig, C. C., C. Herberts & B. A. Thomassin, 1972. Sur l'association de *Phoronis australis* (Phoronidae) avec *Cerianthus mana* (Ceriantharia) dans les zones récifales de Madagascar. *Mar. Biol.*, Vol. 15, pp. 304–315.

Gates, F. L., 1927. A method of proteolytic enzyme titration. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, Vol. 24, pp. 936–937.

Gianetto, R. & C. de Duve, 1955. Comparative study of the binding of acid phosphatase, β-glucuronidase and cathepsin by rat liver particles. *Biochem. J.*, Vol. 59, pp. 433–438.

Hartree, H. H., 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.*, Vol. 48, pp. 422–427.

Jeuniaux, C., 1962. Digestion de la chitine chez les Actiniaires (Coelentérés: Anthozoaires). *Cah. Biol. mar.*, T. 3, pp. 391–400.

Lillie, R. D. 1956. The p-dimethylaminobenzaldehyde reaction for pyrroles in histochemistry: melanins, enterochromatin, zymogen granules, lens. *J. Histochem. Cytochem.*, Vol. 4, pp. 118–129.

Lison, L., 1960. *Histochimie et cytochimie animales, Vols 1 et 2*. Gauthier-Villars, Paris, 842 pp.

Mowry, R., 1963. The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian Blue G 8X and their combinations with the periodic Acid Schiff reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Vol. 106, pp. 402–423.

Péquignat, E., 1972. Some new data on skin digestion and absorption in urchins and sea stars (*Asterias* and *Henricia*). *Mar. Biol*, Vol. 12, 1, pp. 28–41.

Pérès, J. M., 1961. *La vie benthique. Océanographie biologique et biologie marine*. Presses Universitaires de France, Paris, 190 pp.

Tiffon, Y., 1973. Latency and sedimentability of acid hydrolases in sterile septa homogenates of *Cerianthus lloydi* G. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 45B, pp. 731–740.

Tiffon, Y., J. Bouillon & P. Compte, 1969. Étude histologigue, histochimique et biochimique des sécrétions ectodermiques des Cérianthes. *Mar. Biol.*, Vol. 3, pp. 126–133.

Tiffon, Y. & M. Daireaux, 1974. Phagocytose et pinocytose par l'ectoderme et l'endoderme de *Cerianthus lloydi* Gosse. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, Vol. 16, pp. 155–165.